

Qeyri-spesifik immunitetin hüceyrələrinin
təyini.

Faqosit hüceyrələrin NBT testi, faqositar
aktivlik.

- Orqanizmin infeksiya törədicilərdən, atipik və şiş hüceyrələrdən immun müdafiəsi həm spesifik, həm də qeyri-spesifik mexanizmlərlə yerinə yetirilir.
- Qeyri-spesifik immunitetin hüceyrələri və bioloji amilləri **Rezistentlik** adı altında birləşir. Rezistentlik infeksiya törədicilərinə qarşı baryer rolunu oynayur.

Rezistentlik sisteminə aşağıdakı amillər aiddir:

- Dəri və selikli qişaların müdafiə funksiyası
- Faqositar sistem
- Komplement sistemi
- Properdin sistemi
- İnterferon
- Fibronektin
- Kəskin faza zülalları
- Lizosim
- Fosfolipid törəmələri

Faqositar Sistem

Orqanizmin filogenetik və ontogenetik cəhətdən ən qədim müdafiə mexanizmlərinə faqositar sistem aiddir. Faqositozun öyrənilməsi dahi rus alimi Meçnikova məxsusdur. Meçnikov tərəfindən iki növ faqositar hüceyrələr aşkar edilmişdir: toxumada rast gələn faqositlər və periferik qanda rast gələn faqositlər.

Toxuma faqositlərinə iri ölçülü monositlər və makrofaqlar aiddir. Bunlara adətən hərəkətsiz faqositlər deyilir.

Qanda isə faqositlərin makrofaq və mikrofaq növləri mövcüddür.

Faqositlərin təsnifatı

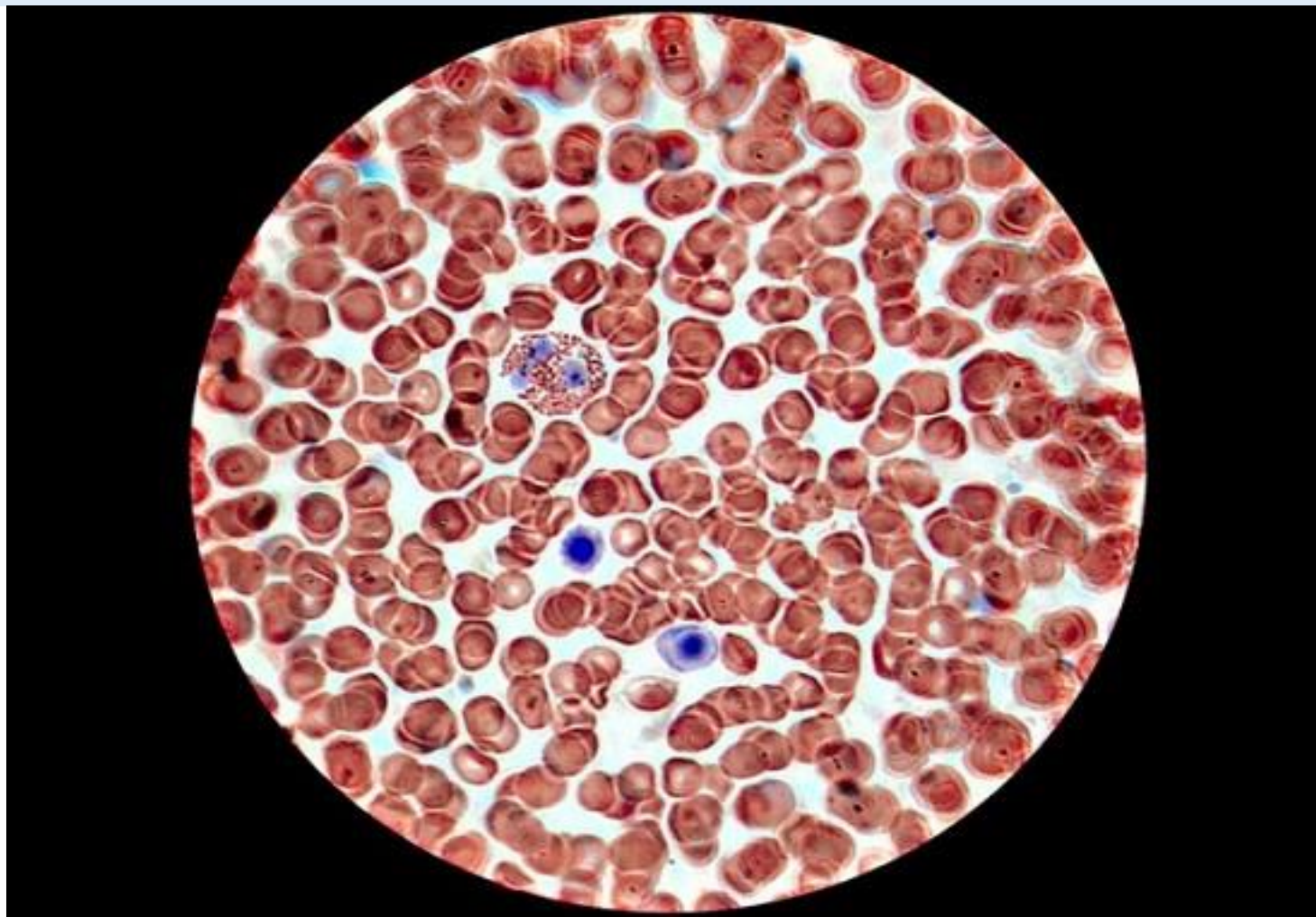
- Faqositlər aşağıdakı qruplara bölünür :
 - - makrofaq və mikrofaqlar
 - - hərəkətli və hərəkətsiz
 - - peşəkar və fakultativ
 -
- Makrofaqlara monositlər, histositlər, endotel və retikuloendotel hüceyrələr aiddir. Mikrofaqlara neytrofillər, eozinofillər bazofillər aiddir.
- Hərəkətli faqositlər qanda olur, hərəkətsizlər toxumada olur.
- Peşəkar faqositlərə neytrofil, monosit, bazofil.
- Fakultativ faqositlərə isə əlavə qoşulan hüceyrələr aiddir. Məs: eozinofil

Faqositozun növləri

- Tam- faqositoz zamanı bütün mərhələlər axıra qədər davam edir
- Natamam-faqositoz zamanı proses faqolizosom mərhələsində dayanır, mikrob inkapsulyasiya olunur və faqosit daxili uzun müddət yaşayır. Məs: vərəm, sifilis, cüzam.
- O-asılı yol – oksigendən asılı yol
- N-asılı yol – nitritdən asılı yol
- Hər iki prosesin gedişində sərbəst anionlar (superoksid O_2^- və nitrit oksid NO) yaranır, bunlar öz növbəsində destruktiv və bakteresid təsir göstərərək AG-ni məhv edir.

- Məməlilərdə faqositar funksiya yalnız 2 tip hüceyrəyə məxsusdur: neyrtofillərə və monosit/makrofaqlara. Onlar hüceyrə tipli (korpuskulyar) AG-ni faqositoza cəlb edə bilər. Faqositozun əsas məqsədi – AG ni biokimyəvi yolla tamamilə məhv etməkdir, bunun üçün faqositlərdə xüsusi fermentlər sintez olunur.
- Neytrofillər periferik qan hüceyrələrinin 60-70% ni təşkil edir, heç zaman toxumalara keçmir və qan vasitəsilə infeksiya ocaqlarına toplanma bilər.
- Qan monositləri isə əksinə qan hüceyrələrinin 5-19% ni təşkil edir və asanlıqla toxumalara keçib hərəkətsiz faqositlərə çevrilir.

Neytrofil



Faqositoz prosesinin mərhələləri

- 1. Antigenə yaxınlaşma-hemotaksis
- 2. Yapışma-adheziya
- 3. Endositoz
- 4. Faqosomun, faqolizosomun əmələ gəlməsi
- 5. Deqranulasiya
- 6. Antigenin məhv edilməsi (lizis)
- 7. Ekzositoz (qalıqların xaric olması).

NK hüceyrələr

- Normal killerlər (NK, natural killerlər)- boz, iri nüvəyə və nazik sitoplazmaya malik olan limfositlərdi. Bu hüceyrələr spontan, yəni heç bir immunizasiya olmadan bəzi şiş və virusla yoluxmuş, qocalmış və zədələnmiş hüceyrələri məhv edə bilər. Onların xarici membranında yerləşən reseptorlar yad və ya öz strukturunu dəyişmiş hüceyrələri və virus zədələnməsini tanıyır.
- NK hüceyrələr T- və B- limfositlərə aid deyil. NK hüceyrələr ümumi sələf limfoid hüceyrəsindən sümük iliyyində diferensiasiya olunur. Onların yetişməsində timus və 2ci limfoid orqanlar heç bir rol oynamır. Qanda dövr edən monositlərin 15%-ə qədəri normal killerlərə aiddir.

Orqanizmdə NK hüceyrələr əsasən qaraciyərdə, dalağın qırmızı pulpasında, selikli qişalarda , ən çox reproduktiv orqanlarda yerləşir.

NK hüceyrələr birbaşa sitotoksik təsir edərək, eyni zamanda sitokin sintezində də iştirak edir. NK hüceyrələrin membranında İL-2, İL-4, İL-10, İL-12, İL-15 və digər sitokinlərə məxsus reseptorlar yerləşir.

Bu hüceyrələrin ən səciyyəvi reseptorları CD16/56+ və CD16/56- NK hüceyrələrini iki subpopulyasiyaya bölür.

CD16/56+ populyasiyası effektor xarakter daşıyır və qanda dövr edir.

CD16/56- populyasiyası isə qanda yox, orqanlarda yerləşir.

- Bundan başqa onların üzərində 1 sinif MHC molekullarına qarşı reseptorlar var. Bu reseptorlar NK –nın killer funksiyasını KAR (killer activatory receptors) reseptoru vasitəsi ilə coxaldır və KİR (killer inhibitory receptors) reseptoru vasitəsi ilə azalda bilir .

Diagnostika üsulu

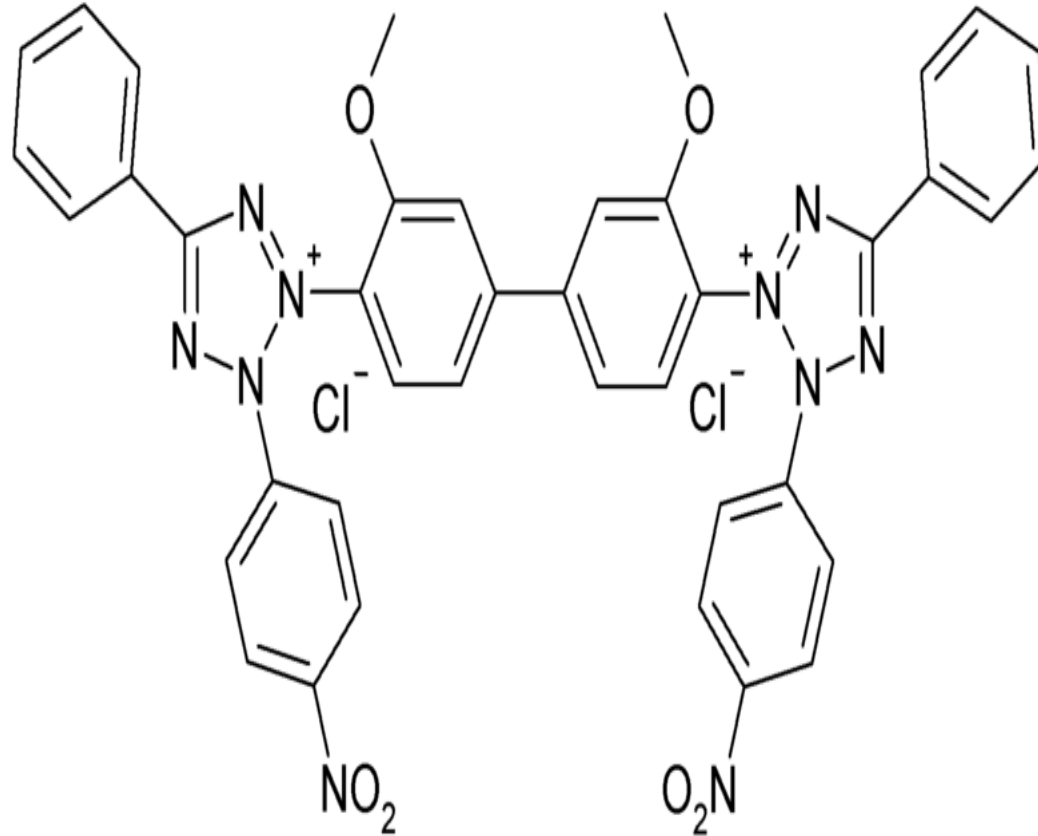
NBT testi

Qanda yad və xəstəlik əmələ gətirən mikroorqanizmləri məhv edə bilən faqositlərin aktivliyini müəyyən edən testdir. Qanın faqosit hüceyrələrinə monosit və neytrofillər aiddir.



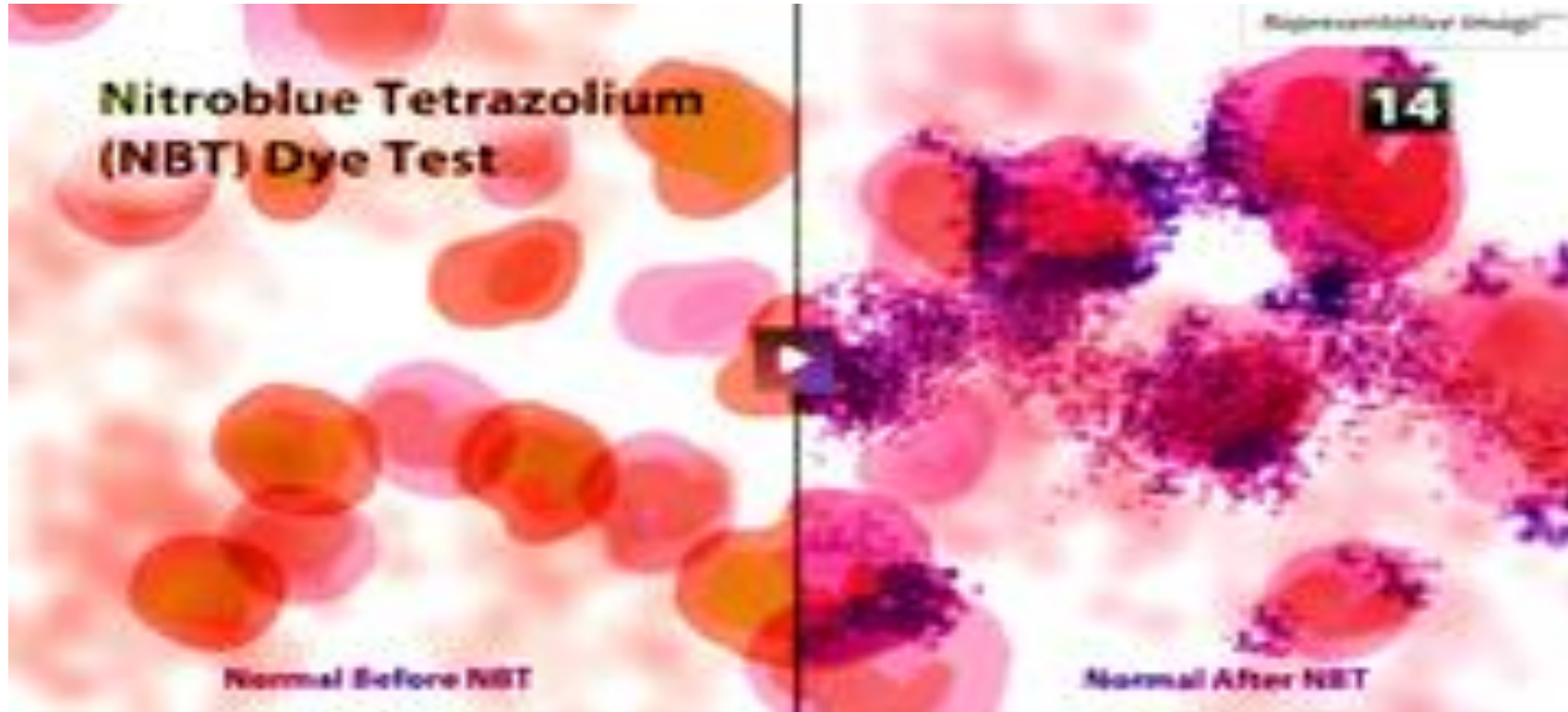
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) Nitro blue tetrazolium- suda əriyən sarı rəngli tetrazolium boyasıdır. İki tetrazol həlqədən ibarət mürəkkəb kimyəvi maddədir.

- $C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$
- Molyar kütləsi
817,65 g/mol⁻¹
- Sarı rəngli kristaldır
- Suda pis həll olur
- 189 dərəcədə əriyir



Xüsusiyyəti

- Bu test rəngsiz müəyyən İmmun sistem hüceyrələrinin Nitroblue Tetrazoliumun təsirindən tünd göy rəngə çevrilməsinə əsaslanır



NBT-test

- Nitroblue Tetrazoliumun testinin mahiyyəti ətraf mühitdən Nitroblue Tetrazoliumun (NBT) faqosit hüceyrələr tərəfindən udulması və onun tünd-mavi diformazana reduksiya edilməsinə əsaslanır. NBT-nin reduksiya edilmə aktivliyi hüceyrənin bakterisid peroksidaza sisteminin vəziyyətini əks etdirir və superoksid radikalların yaranması ilə korrelyasiya edir
- Qanın qeyri-aktiv qranulositlərinin antigenə qarşı qıcıqlanma dərəcəsini qiymətləndirməyə imkan verir. Hüceyrədaxili antibakterial sistemlərin aktivləşmə dərəcəsini təyin edir.



Göstərişlər

- Xronik qranulomatoz xəstəliyin diaqnostikası üçün
- Residiv infeksiyalar, xronik və ağır gedişli infeksiyon xəstəliklər
- İrsi və ya qazanılmış immunodefisit halların olmasına şübhə
- Autoimmun xəstəliklər
- Allergik xəstəliklər
- Onkoloji xəstəliklər
- Qazanılmış immun çatışmazlığı sindromu(QİÇS) olmasına şübhə
- Transplantasiyadan öncə və sonra resipientlərin müayinəsi
- Ciddi cərrahi müdaxilələrdən öncə pasiyentlərin müayinəsi
- Əməliyyatsonrası dövrün ağır keçməsi
- Sitostatiklər, immunodepressantları və immunomodulyatorlar ilə müalicəyə nəzarət edilməsi



Lazım olan vəsaitlər və hazırlıq

Tədqiqat üçün qan mütləq acqarına götürülməlidir (son qida qəbulundan 8 saatdan az olmayaraq)

- Nitroblue Tetrazoliumun 0,2%-li məhlulu (Pappenheym boyağı)
- Metil yaşılının 2%-lu sulu məhlulu
- KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , qlükoza, NaCl
- Su hamamı
- Metanol
- Əşya şüşələri, mikropipetlər, mikroskop
- Silikonlu probirkalar
- Heparin



Spontan və stimülə edilmiş NBT-test ayırd edilir.

Spontan testin nəticəsi pasiyentin qanındakı aktivləşmiş hüceyrələrin sayını göstərir, məsələn infeksiya zamanı.

Stimülə edilmiş testin nəticələri isə tədqiq olunan neytrofillərin in vitro aktivləşmə qabiliyyəti haqda təsəvvür yaratmağa imkan verir.



İşlək məhlulun hazırlanması

- **I məhlul – Fosfat buferi.** pH-ı 7,2 olan 1% 15 M fosfat buferi. 0,2% qlükoza və 0,6% natrium xlorid məhlulu əlavə etməklə (25 ml 1/15 M KH_2PO_4 –a 36 ml 1/15 M Na_2HPO_4 məhlulu əlavə edilir; 61 ml buferə 120 mq qlükoza və 370 mq NaCl əlavə etmək lazımdır).
- **II məhlul – ilkin NBT məhlulu.** Natrium xloridin izotonik məhlulunda 0,2% nitrotetrazol mavisi məhlulu. Boyağın alınması üçün uzun müddət qarışdırılması və qaynar suda qızdırılması lazımdır. Hazır məhlulu satışda da əldə etmək olar.
- I və II məhlullar məhlulları kağız filtrlərdən süzülür və 2-4 həftə müddətində soyuducuda 10°C temperaturda saxlanılır. İşlək məhlul hər testdən bilavasitə əvvəl hazırlanmalıdır. NBT-nin işlək məhlulunu hazırlamaq üçün ilkin 0,2 məhlul və fosfat buferi bərabər həcmlərdə qarışdırılır və qarışıq $30-37^\circ\text{C}$ -də qızdırılır.



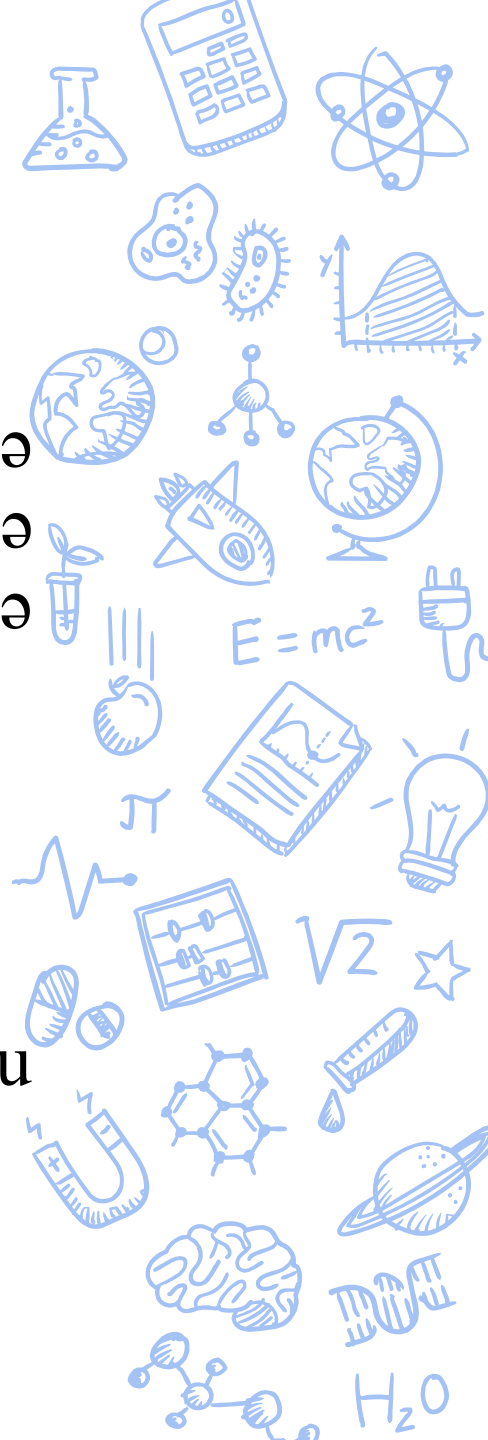
Spontan testin qoyuluşu

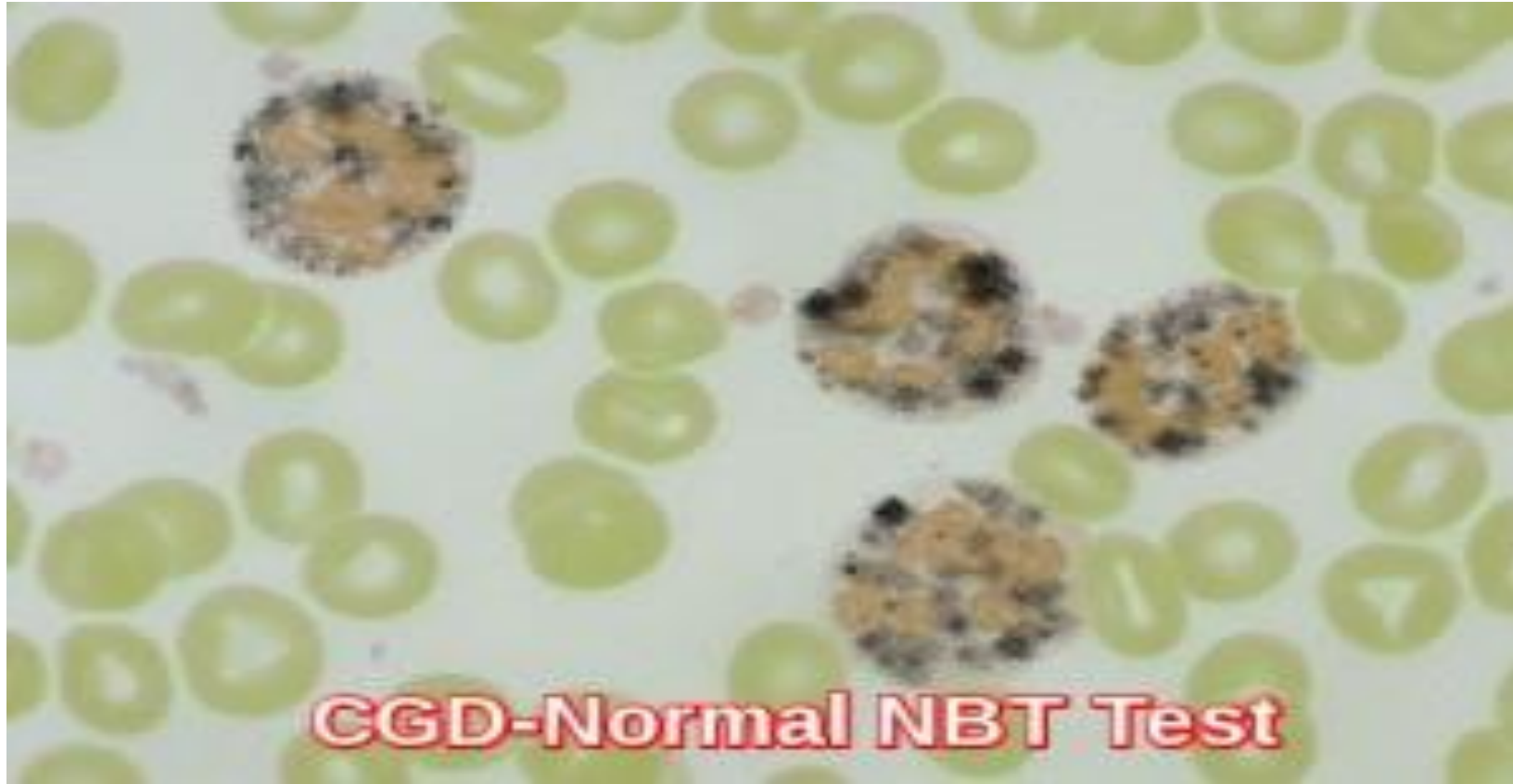
- Qan antikoaglyant kimi heparin işlədilməklə götürülür (heparinin qatılığı 75-100 vahid/ml qan olmalıdır). Plastik əşya şüşəsinin çuxurcuğuna pipetlə 0,1 ml qan əlavə edilir. Qan olan çuxurcuqların hər birinə 0,1 ml hazırlanmış “işlək” NBT məhlulundan əlavə edilir (1:1 nisbətində).
- Əşya şüşəsi örtük şüşəsi ilə örtülür və 37°-də 20 dəqiqə ərzində inkubasiya edilir. Daha sonra yenə 10 dəq. müddətində otaq temperaturunda inkubasiya edilir.
- Paster pipeti və ya bakterial ilgək istifadə etməklə qarışıq yaxılır və havada qurudulur.
- Yaxmalar 3 dəq. metanol ilə fiksə olunur.
- Yaxma quruduqdan sonra Romanovski-Gimza boyası ilə boyanır.



Stimulyasiyalı testin qoyuluşu:

- Qabaqca heparinləşdirilmiş 0,1 ml qan bərabər həcmdə stimulyator ilə (məs., bakteriya endotoksini ilə, liofilizə olunmuş avirulent bakteriya filtratı ilə, tərkibində limfokinlər olan supernatant ilə, və s.) qarışdırılır
- Qarışıq 37°C -də 30 dəq. müddətində inkubasiya edilir.
- Daha sonra qarışıqdan 0,1 ml götürülərək NBT-test olduğu kimi aparılır.





Boyanmış yaxma immersion obyektiv altında baxılır və ən azı 100 neytrofil sayılır. Müsbət nəticə verən neytrofillərin miqdarı faizlə ifadə edilir. Tərkibində formazan qalıqları olan neytrofillər müsbət kimi qiymətləndirilir. Əgər neytrofilin 1/3 hissəsi doludursa bu faqositar aktiv hüceyrə sayılır. NBT testinin norması 65-88% sayılır.

Testin nəticəsi. 200 neytrofil hüceyrəsi arasında NBT pozitiv hüceyrələrin miqdarı sayılır. Pozitiv NBT hüceyrələrinin faizlə miqdarı hesablanır. Pozitiv NBT hüceyrələrinin miqdarı normada 10%-dən çox olmalıdır. Pozitiv NBT hüceyrələrinin faizlə miqdarı normaya uyğun gələrsə, test pozitiv hesab olunur.

Əgər pozitiv NBT hüceyrələrin miqdarı normada az olarsa, bu orqanizmdə neyrofillərin faqositar funksiyasının pozulmasını göstərir ki, bu zaman onlarda sərbəst radikalların əmələ gəlməsi pozulur və udulmuş antigen lizisə uğradıla bilmir. Məsələn, xroniki qranulomatoz xəstəlikləri zamanı.



Chronic granulomatous disease

Normal phagocyte

Dysfunction of phagocyte

